

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 1/08, B03C 1/01, C03C 17/30, C12Q 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/16781 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. April 1999 (08.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06196 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. September 1998 (29.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 43 518.1 1. Oktober 1997 (01.10.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Fichtenstrasse 18, D-82377 Penzberg (DE). MARK- ERT-HAHN, Christine [DE/DE]; Saelweiherstrasse 54, D-82377 Penzberg (DE). HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, PL, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 16. September 1999 (16.09.99)	
(54) Title: AUTOMATABLE METHOD FOR PREPARING SAMPLES WHICH CAN BE UNIVERSALLY APPLIED (54) Bezeichnung: AUTOMATISIERBARE UNIVERSELL ANWENDBARE PROBENVORBEREITUNGSMETHODE (57) Abstract The invention relates to a method for preparing biological samples for a subsequent detection of an analyte, especially of a nucleic acid, in said sample. The invention also relates to the preparation of reagent kits, novel devices for preparing samples and novel magnetic pigments. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung biologischer Proben für den anschließenden Nachweis eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, in dieser Probe. Weiterhin werden Reagenzienkits und neue Vorrichtungen zur Probenvorbereitung sowie neue magnetische Pigmente bereitgestellt.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H1/08 B03C1/01 C03C17/30 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H B03C C03C C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 41811 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;KLEIBER JOERG (DE); WALTER THOMAS (DE);) 27 December 1996 (1996-12-27) cited in the application see the whole document, in particular examples 3 and 4 ---	1-18, 21-27
X	EP 0 757 106 A (TOYO BOSEKI) 5 February 1997 (1997-02-05) cited in the application see the whole document, in particular example 1 ---	1,4-6, 24-27
X	WO 88 06633 A (ARNOLD LYLE JOHN JR ;NELSON NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MARK ALA) 7 September 1988 (1988-09-07) claims 1-19 --- -/-	1,4-6, 24-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 1999

Date of mailing of the international search report

28/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06196

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BOOM R ET AL: "RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,</p> <p>vol. 28, no. 3, March 1990 (1990-03),</p> <p>pages 495-503, XP002911989</p> <p>ISSN: 0095-1137</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1,4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9641811 A	27-12-1996	DE 19520398 A	12-12-1996
		DE 19537985 A	17-04-1997
		AU 6300796 A	09-01-1997
		CA 2223821 A	27-12-1996
		CN 1192217 A	02-09-1998
		EP 0837871 A	29-04-1998
		NO 975772 A	06-02-1998
EP 0757106 A	05-02-1997	JP 9019292 A	21-01-1997
WO 8806633 A	07-09-1988	AT 107654 T	15-07-1994
		AU 1426988 A	26-09-1988
		DE 3850273 D	28-07-1994
		DE 3850273 T	29-09-1994
		DK 607588 A	28-12-1988
		EP 0281390 A	07-09-1988
		ES 2054797 T	16-08-1994
		FI 885022 A	01-11-1988
		JP 1502319 T	17-08-1989
		JP 2862547 B	03-03-1999
		KR 9600479 B	08-01-1996
		PT 86881 A	30-03-1989
		US 5599667 A	04-02-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06196

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C07H1/08 B03C1/01 C03C17/30 C12Q1/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07H B03C C03C C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 41811 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;KLEIBER JOERG (DE); WALTER THOMAS (DE);) 27. Dezember 1996 (1996-12-27) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument, insbesondere Beispiele 3 und 4	1-18, 21-27
X	EP 0 757 106 A (TOYO BOSEKI) 5. Februar 1997 (1997-02-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument, insbesondere Beispiel 1	1,4-6, 24-27
X	WO 88 06633 A (ARNOLD LYLE JOHN JR ;NELSON NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MARK ALA) 7. September 1988 (1988-09-07) Ansprüche 1-19	1,4-6, 24-27
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 21. Juli 1999		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 28/07/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Scott, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BOOM R ET AL: "RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 28, Nr. 3, März 1990 (1990-03), Seiten 495-503, XP002911989 ISSN: 0095-1137 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----</p>	1,4-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06196

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9641811 A	27-12-1996	DE 19520398 A	12-12-1996
		DE 19537985 A	17-04-1997
		AU 6300796 A	09-01-1997
		CA 2223821 A	27-12-1996
		CN 1192217 A	02-09-1998
		EP 0837871 A	29-04-1998
		NO 975772 A	06-02-1998
EP 0757106 A	05-02-1997	JP 9019292 A	21-01-1997
WO 8806633 A	07-09-1988	AT 107654 T	15-07-1994
		AU 1426988 A	26-09-1988
		DE 3850273 D	28-07-1994
		DE 3850273 T	29-09-1994
		DK 607588 A	28-12-1988
		EP 0281390 A	07-09-1988
		ES 2054797 T	16-08-1994
		FI 885022 A	01-11-1988
		JP 1502319 T	17-08-1989
		JP 2862547 B	03-03-1999
		KR 9600479 B	08-01-1996
		PT 86881 A	30-03-1989
		US 5599667 A	04-02-1997



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 21/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/16781
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. April 1999 (08.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06196		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, PL, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. September 1998 (29.09.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 43 518.1 1. Oktober 1997 (01.10.97) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Fichtenstrasse 18, D-82377 Penzberg (DE). MARK-ERT-HAHN, Christine [DE/DE]; Saelweiherstrasse 54, D-82377 Penzberg (DE). HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			
(54) Title: AUTOMATABLE METHOD FOR PREPARING SAMPLES WHICH CAN BE UNIVERSALLY APPLIED			
(54) Bezeichnung: AUTOMATISIERBARE UNIVERSELL ANWENDBARE PROBENVORBEREITUNGSMETHODE			
(57) Abstract			
The invention relates to a method for preparing biological samples for a subsequent detection of an analyte, especially of a nucleic acid, in said sample. The invention also relates to the preparation of reagent kits, novel devices for preparing samples and novel magnetic pigments.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung biologischer Proben für den anschließenden Nachweis eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, in dieser Probe. Weiterhin werden Reagenzienkits und neue Vorrichtungen zur Probenvorbereitung sowie neue magnetische Pigmente bereitgestellt.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Automatisierbare universell anwendbare Probenvorbereitungsmethode

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung biologischer Proben für den anschließenden Nachweis eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, in dieser Probe. Weiterhin werden Reagenzienkits und neue Vorrichtungen zur Probenvorbereitung sowie neue magnetische Pigmente bereitgestellt.

10

Bei einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer biologischen Probe werden an die Probenvorbereitung oft besondere Anforderungen gestellt. Zum einen ist der Analyt oft in sehr geringer Konzentration vorhanden und zum anderen finden sich oft viele andere Substanzen in der Probe, die die Isolierung bzw. Bestimmung des Analyten beeinträchtigen können.

15

WO 96/41811 offenbart ein Verfahren zur Isolierung eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, aus einer biologischen Probe, wobei die Probe, die den Analyten in einer Flüssigkeit enthält, mit magnetischen Partikeln, die eine äußere Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von < 10 nm aufweist, in Kontakt gebracht wird, unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Partikeloberfläche bindet, und der gebundene Analyt von der Probenflüssigkeit abgetrennt wird. Das in WO 96/46811 beschriebene Verfahren eignet sich sehr gut zur Aufreinigung eines Analyten aus einer biologischen Probe. Es ist jedoch nicht ohne weiteres für eine automatisierte Probenvorbereitung einsetzbar.

20

25

Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990), 495-503) beschreiben ebenfalls ein Protokoll für Aufreinigung von Nukleinsäuren aus einer biologischen Probe unter Verwendung größenfraktionierter Siliciumoxidteilchen. Dieses

30

- 2 -

Verfahren ist jedoch umständlich, nicht für eine Automatisierung geeignet und enthält darüber hinaus die Gefahr von Verschleppungen.

Bei einer in EP-A-O 757 106 beschriebenen Methode zur Extraktion von Nukleinsäuren wird eine Probe lysiert, die in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren an superparamagnetische Metallteilchen gebunden, diese mit einer Pipette aus dem Probengefäß entfernt und somit von den übrigen Probenbestandteilen abgetrennt. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß aufgrund der Notwendigkeit, den Analyten mit einer Pipette aus der Probe zu entfernen, Verluste auftreten können. Darüber hinaus beinhaltet die Verwendung mehrerer Reaktionsgefäße die Gefahr von Verschleppungen und Kontaminationen.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein neues Probenvorbereitungsverfahren bereitzustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind. Insbesondere soll das neue Verfahren automatisierbar sein und ein möglichst einfaches Temperaturprofil aufweisen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
- (b) Zugabe einer festen Adsorptionsmatrix,
- (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
- (d) Entfernen nichtgebundener Probenbestandteile aus dem Reaktionsgefäß,
- (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
- (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix.

- 3 -

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
 - 5 (b) Zugabe einer festen Adsorptionsmatrix,
 - (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
 - (d) Abtrennen nichtgebundener Probenbestandteile von der Adsorptionsmatrix,
 - 10 (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
 - (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix,
- wobei zumindest die Schritte (c) und (d) bei im wesentlichen der gleichen Temperatur durchgeführt werden.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von Analyten an eine feste Adsorptionsmatrix in Gegenwart eines Probenaufschlußpuffers, wobei der Analyt, bei dem es sich vorzugsweise um eine Nukleinsäure wie DNA, z.B. chromosomale DNA, fragmentierte chromosomale DNA, Plasmid-DNA, virale DNA etc., oder RNA, z.B. mRNA, tRNA, rRNA oder virale RNA etc. handelt, von Verunreinigungen der Probe wie etwa Proteinen oder Zelltrümmern abgetrennt wird. Die Probe kann eine beliebige biologische Probe sein, z.B. eine Körperflüssigkeit wie Blut, Plasma, Urin etc, eine Gewebeprobe, eine Probe von kultivierten Zellen oder

25 ähnliches.

25

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Adsorptionsmatrix ist in der Lage, eine unter den Reaktionsbedingungen weitgehend selektive Bindung des Analyten zu gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man eine partikuläre Adsorptionsmatrix, die vorzugsweise eine Glasoberfläche enthält.

30 Besonders bevorzugt sind magnetische Glaspartikel, insbesondere die in WO 96/41811 beschriebenen magnetischen Partikel mit einer äußeren

Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Besonders bevorzugt sind ferromagnetische Partikel, die eine Korngröße zwischen 10 und 60 μm aufweisen. Solche Partikel können beispielsweise einen Kern aus Glimmer und darauf immobilisierten Magnetpartikeln enthalten, der von der Glasschicht umschlossen ist. Während in WO 96/41811 die magnetischen Partikel in fester Form, z.B. als Tabletten oder Pulver, in den jeweils verwendeten Reaktionsgefäßen vorgelegt werden, setzt man die magnetischen Partikeln erfindungsgemäß vorzugsweise in Form einer Suspension ein. Besonders geeignet haben sich alkoholische Suspensionen mit einer Konzentration von etwa 5 bis 20 mg/ml erwiesen. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß trotz der hohen spezifischen Dichte der magnetischen Glaspartikel die Suspension mit hoher Reproduzierbarkeit aus einem Vorratsbehälter abgezogen werden kann, wodurch eine Automatisierbarkeit der Verfahrensführung ermöglicht wird.

Obwohl beim erfindungsgemäßen Verfahren die in WO 96/41811 beschriebenen Glaspartikel gute Resultate zeigen, werden besonders gute Ergebnisse mit Glaspartikeln erhalten, deren Glasphase folgende Metalloxide umfasst. SiO_2 , B_2O_3 , Alkalimetalloxid, z.B. K_2O oder/und Na_2O sowie gegebenenfalls Al_2O_3 und ein Erdalkalimetalloxid z.B. CaO . Die Anteile dieser Metalloxide sind vorzugsweise wie folgt: 50 bis 95 mol-% SiO_2 , 0,2 bis 30 mol-% B_2O_3 , 0 bis 10 mol-% Al_2O_3 , 0 bis 20 mol-% Erdalkalimetalloxid und 0,2 bis 20 mol-% Alkalimetalloxid, wobei die Prozentangaben jeweils auf das Gesamtgewicht der Glasphase bezogen sind.

Für die Isolierung von RNA hat sich beispielsweise eine Glasphase, die SiO_2 , B_2O_3 , K_2O , Al_2O_3 und CaO enthält, als besonders geeignet erwiesen. Für die Isolierung von DNA hat sich eine Glasphase, die SiO_2 , B_2O_3 und Na_2O enthält, als besonders geeignet erwiesen.

Die Adsorptionsmatrix wird beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in einer Menge zugegeben, welche der minimalen, zur quantitativen Bindung des in der Probe vorhandenen Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, benötigten Menge entspricht oder etwas größer, vorzugsweise um höchstens 50% und besonders bevorzugt um höchstens 20% über dieser Menge liegt. Die zu erwartende Nukleinsäuremenge in verschiedenen Arten von Proben kann - sofern sie nicht bereits bekannt ist - vorab durch übliche Techniken, z.B. Phenol/ Chloroform-Extraktion und anschließende Messung der optischen Dichte ermittelt werden.

10

Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß. Dieser Aufschluß erfolgt im Allgemeinen durch Lyse der in der Probe vorhandene Zellen unter denaturierenden Bedingungen, z.B. durch Zugabe einer Protease und eines Denaturierungspuffers. Als Proteinase wird vorzugsweise Proteinase K, Pronase, Elastase oder/und Lysozym verwendet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Proteinase K.

15

Der Proteaseverdau erfolgt in einem Denaturierungspuffer, der eine chaotrope Verbindung, z.B. Harnstoff oder Harnstoffderivate, vorzugsweise ein chaotropes Salz, besonders bevorzugt ein Guanidiniumsalz wie etwa Guanidiniumhydrochlorid (insbesondere zur Isolierung von DNA) oder Guanidiniumthiocyanat (insbesondere zur Isolierung von RNA) oder ein Perchlorat oder Iodid enthält. Für Guanidiniumsalze sind Konzentrationen im Bereich von 1 bis 3 mol/l bevorzugt.

20

25

Im Gegensatz zu der in WO 96/41811 beschriebenen Methode zur Probenvorbereitung erfolgt die Zugabe der festen Adsorptionsmatrix erst nach Aufschluß der Probe. Durch diese Verfahrensführung erreicht man eine signifikant geringere unspezifische Bindung von unerwünschten Probenbestandteilen, z.B. Proteinen, an der Adsorptionsmatrix.

30

- 6 -

Gemäß Schritt (c) erfolgt die selektive Bindung des Analyten an die Adsorptionsmatrix durch Inkubation im Aufschlußpuffer vorzugsweise unter chaotropen Bedingungen.

- 5 Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Abtrennen nicht gebundener Probenbestandteile von der Adsorptionsmatrix. Vorzugsweise werden hierzu die nichtgebundenen Probenbestandteile aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Dies kann durch gegebenenfalls mehrmaliges Zugabe und Entfernen eines Waschpuffers erfolgen, der vorzugsweise einen Gehalt von
10 mindestens 50% (v/v) und besonders bevorzugt von mindestens 60% (v/v) eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels wie etwa Ethanol, Propanol und Aceton enthält.

- Die Schritte (c), (d) oder/und (e) des erfindungsgemäßen Verfahren erfolgen
15 vorzugsweise unter kontinuierlichem oder intervallartigem Mischen (d.h. Phasen, während denen gemischt wird, wechseln sich mit Phasen ab, in denen sich das Reaktionsgefäß im Ruhen befindet) ohne Zusatz externer Mittel. Vorzugsweise erfolgt dieses Mischen durch Drehung des Reaktionsgefäßes um seine Längsachse mit mehrmaliger Umkehr der Drehrichtung.
20 Besonders bevorzugt wird das Mischungsgefäß exakt um seine Längsachse gedreht und der Drehrichtungswechsel so durchgeführt, daß die Meniskusauslenkung der Flüssigkeit unter einer vorbestimmten Trennziffer bleibt. Solche Mischverfahren sind in WO91/15768 und EP-A-0 435 481 beschrieben.

- 25 Die Dauer für die Schritte (c) oder/und (e) beträgt vorzugsweise maximal 20 min und umfaßt ein kontinuierliches Mischen oder ein Intervallmischen in kurzen Zyklen, vorzugsweise in kurzen Zyklen von vorzugsweise maximal 2 Minuten. Besonders gute Ergebnisse wurden durch Intervallmischen in
30 einem einminütigen Zyklus umfassend 20 sec Mischen und 40 sec Ruhen erhalten.

Bei Verwendung von magnetischen Partikeln als Adsorptionsmatrix kann die Zugabe von Flüssigkeiten in das Reaktionsgefäß bzw. das Absaugen von Flüssigkeiten daraus unter kontinuierlichem Mischen erfolgen, wobei die Partikel während des Absaugevorgangs durch Einschalten des Magneten im Reaktionsgefäß gehalten werden. Durch diese Mischtechnik kann das erfindungsgemäße Verfahren flexibel auf verschiedene Probenarten eingestellt werden. Darüber hinaus wird ständig für eine gleichmäßige Verteilung der magnetischen Partikel in der Flüssigphase gesorgt.

10 Schritt (e) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix. Hierzu kann einerseits - wie aus dem Stand der Technik bekannt - ein von organischen Lösungsmitteln im wesentlichen freier Puffersalzpuffer verwendet werden. Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß der Elutionspuffer zusätzliche Reagenzien enthalten kann, wie etwa Enzyme, z.B. zur Manipulation von Nukleinsäuren verwendete Enzyme wie etwa RNasen, DNasen, Restriktionsendonukleasen, Ligasen, terminale Transferasen oder/und Polymerasen. Wenn der Analyt beispielsweise eine DNA ist, kann während der Elution eine DNase-freie RNase zugesetzt werden, um den Gehalt an unerwünschter RNA zu verringern. Andererseits kann - wenn der Analyt eine RNA ist - während der Elution eine RNase-freie DNase zugesetzt werden. Auf entsprechende Weise können auch andere Enzyme, wie etwa Restriktionsendonukleasen, etc. zugesetzt werden. Wenn die durch das erfindungsgemäße Verfahren isolierte Nukleinsäure nachfolgend einer Amplifikation unterzogen wird, kann während der Elution auch ein Nukleinsäureamplifikations-Mastermix, welcher den Amplifikationspuffer, Nukleotide, Primer, Polymerase und Puffersalze enthält, zugesetzt werden.

30 Schritt (f) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix. Dieses Abtrennen kann auf übliche Weise erfolgen, z.B. durch Sedimentation, vorzugsweise aber durch magnetische Separation.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren isolierten Analyten können anschließend auf bekannte Weise weiterverarbeitet werden; im Fall von Nukleinsäuren, z.B. durch Amplifikation und nachfolgende Detektion, Detektion ohne vorhergehende Amplifikation oder Sequenzierung. Hierzu
5 können Aliquots des Eluats selbst Bestimmungen unterschiedlicher Analyten zugeführt werden, z.B. verschiedene Viren, wie HIV, HCV und HBV.

Ein wichtiges Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß viele oder gegebenenfalls sogar alle Schritte bei im wesentlichen der gleichen
10 Temperatur, d.h. innerhalb eines Temperaturbereichs von $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden können. Vorzugsweise ist diese Temperatur im Bereich von Raumtemperatur bis 70°C , besonders vorzugt von Raumtemperatur bis 40°C , am meisten bevorzugt bei Raumtemperatur, d.h. ca. 18 bis 32°C . In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens
15 werden zumindest die Schritte (c) der Adsorption und (d) des Waschens bei dieser Temperatur durchgeführt. Besonders bevorzugt werden auch andere Schritte, insbesondere die Schritte (a) des Aufschließens oder/und (e) der Elution bei dieser Temperatur durchgeführt. Für die Bestimmung von HIV in Blutproben kann beispielsweise die gesamte Probenvorbereitung bei einer
20 einheitlichen Temperatur erfolgen. Gegebenenfalls kann nach Schritt (f) des erfindungsgemäßen Verfahrens zusätzlich ein Nachbehandlungsschritt bei erhöhter Temperatur erfolgen, wodurch bei bestimmten Analyten die Ausbeuten bei einer Amplifikation verbessert wird. Bei anderen Analyten kann es erforderlich sein, daß die Vorbehandlung oder/und die Elution bei
25 einer erhöhte Temperatur erfolgen. Die erhöhte Temperatur liegt dabei vorzugsweise im Bereich von mehr als 40°C bis 95°C , z.b. ca. 70°C .

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise in einer automatisierten Vorrichtung. Beispiele für solche Vorrichtungen sind
30 nachfolgend beschrieben. Weiterhin ist bevorzugt, daß das erfindungs-

gemäßes Verfahren zur Probenvorbereitung, zumindest die Schritte (a) bis (e) in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden, d.h. daß kein Transfer in ein anderes Reaktionsgefäß erfolgt. Dies hat eine erhebliche Vereinfachung des Verfahrens zur Folge und führt darüber hinaus zu einem
5 verringertem Kontaminationsrisiko.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzienkit, der insbesondere zur Durchführung des vorstehend beschriebenen Verfahrens geeignet ist, umfassend

- 10 (a) eine Protease,
- (b) einen Probenaufschlußpuffer,
- (c) einen Waschpuffer,
- (d) einen Elutionspuffer und
- (e) eine Suspension von magnetischen Glaspartikeln.

15

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Isolierung von DNA, umfassend magnetische Glaspartikel deren Glasphase SiO_2 , B_2O_3 und Na_2O enthält, und ein Reagenzienkit zur Isolierung von RNA, umfassend magnetische Glaspartikel, deren Glasphase SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 ,
20 CaO und K_2O enthält.

Schließlich noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend:

- 25 - einen Probenvorbereiter (1),
- eine Aufnahmeeinrichtung für Reagenzien (2),
- eine erste Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung (3), die für eine Betriebstemperatur von $\leq 70^\circ\text{C}$, insbesondere $\leq 40^\circ\text{C}$ eingerichtet ist,
- 30 - eine zweite Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße (4a, 4b, 4c), die gegebenenfalls Kühl- oder/und Heizmittel enthält,
- und ein Robotik-Werkzeugmittel (5).

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist vorzugsweise so ausgestaltet, daß ein einziges Reaktionsgefäß zur Durchführung der 4 Hauptschritte der Probenvorbereitung, nämlich Aufschluß einer Probe bzw. Lyse, Adsorption des freigesetzten Analyten, z.B. einer Nukleinsäure, an eine feste Adsorptionsmatrix, z.B. magnetische Glaspartikel, Waschen der Adsorptionsmatrix und Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.

Die Vorrichtung ist so ausgestaltet, daß die erste Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme der Reaktionsgefäße für die Probenvorbereitung zumindest für die Adsorption des Analyten an die feste Adsorptionsmatrix und für das Waschen der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erste Aufnahmeeinrichtung weiterhin zum Aufschluß der Probe oder/und zur Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen. Die Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung haben ein Volumen von vorzugsweise mindestens 1 ml, z.B. 1-5 ml.

Die zweite Aufnahmeeinrichtung ist für Reaktionsgefäße zur Aufbewahrung oder/und Weiterverarbeitung des Analyten vorgesehen, z.B. PCR-Gefäße, die üblicherweise eine von den zur Probenvorbereitung verwendeten Reaktionsgefäßen verschiedene Form aufweisen. Die Reaktionsgefäße zur Aufbewahrung oder/und Weiterverarbeitung haben ein Volumen von vorzugsweise bis zu 500 μ l, z.B. 50-200 μ l. Darüber hinaus kann die zweite Aufnahmeeinrichtung Gefäße für Reagenzien enthalten, die zur Weiterverarbeitung der den Analyten enthaltenden Probe benötigt werden, z.B. einen PCR-Mastermix.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann so ausgestaltet sein, daß einer oder mehrere Schritte der Probenvorbereitung oder/und ein Nachbehandlungsschritt bei einer erhöhten Temperatur in der zweiten Aufnahmeeinrichtung erfolgen können. Hierzu kann die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Reaktionsgefäßen für zumindest einen Behandlungsschritt vorgesehen sein, der ausgewählt ist aus dem Aufschluß der Probe, der

- 11 -

Elution der Probe von der Adsorptionsmatrix und einem Nachbehandlungsschritt nach der Elution.

- Die erste Aufnahmeeinrichtung umfaßt vorzugsweise Mittel zur magnetischen Separation. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erste Aufnahmeeinrichtung Mittel zum Mischen der Reaktionsgefäße, insbesondere durch Drehen um deren Längsachse umfaßt. Solche Mittel können gegebenenfalls auch für die zweite Aufnahmeeinrichtung vorgesehen sein.
- 10 Das Robotik-Werkzeug umfaßt im allgemeinen automatische Pipettier-einrichtungen sowie gegebenenfalls Mittel zum Transport von Reaktionsgefäßen, z.B. zwischen erster und zweiter Aufnahmeeinrichtung. Außerdem kann eine Deckel-Öffnungs- und Schließeinheit integriert sein.
- 15 Im folgenden sind spezielle Ausführungsformen für erfindungsgemäße Vorrichtungen im Detail dargestellt. Bei der in Abbildung 1 gezeigten Ausführungsform enthält der Probenvorbereiter (1) eine Aufnahmeeinrichtung für Reagenzien (2), eine Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung (3) mit den Funktionen Mischen und Magnetseparation, die für eine Temperatur von vorzugsweise $\leq 40^{\circ}\text{C}$ und besonders bevorzugt Raumtemperatur vorgesehen ist. Weiterhin enthält die Vorrichtung eine Aufnahmestation für weitere Reaktionsgefäße (4a), z.B. für PCR-Gefäße, die eine Temperatur von 4°C bis Raumtemperatur aufweist. Weiterhin enthält die Vorrichtung automatisierte Einrichtungen für die
- 20 Pipettierung und Handhabung von Reaktionsgefäßen (5), die Bewegungen in X, Y und Z Richtung ermöglichen. Bei dieser Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung finden die vier Hauptschritte der Probenvorbereitung, nämlich Lyse, Adsorption, Waschen und Elution in der ersten Aufnahmeeinrichtung in einem einzigen Reaktionsgefäß statt. Die Lagerung von Eluaten und die Zugabe weiterer Reagenzien, z.B. PCR-Mastermix, erfolgt in der zweiten Aufnahmeeinrichtung. Zur Weiterverarbeitung, z.B. für
- 25
30

- 12 -

eine nachfolgende PCR, werden die Gefäße zu einer entsprechenden Vorrichtung, z.B. einem Thermocycler (nicht gezeigt) transferiert.

In der in Abbildung 2 gezeigten Ausführungsform enthält die Vorrichtung
5 eine zweite Aufnahmeeinrichtung (4b), die zur Aufnahme von Weiterver-
arbeitungsreaktionsgefäßen, z.B. PCR-Gefäßen, vorgesehen ist und die
Einstellung einer Temperatur von 4°C (Kühlung des PCR-Mastermix) bis
95°C zum Erhitzen des Eluats nach der Elution von der Adsorptionsmatrix
vorgesehen ist. Zur Vermeidung der Kondensatbildung am Deckel der PCR-
10 Gefäße ist eine Deckelgegenheizung bevorzugt.

Gemäß der in Abbildung 3 dargestellten Ausführungsform der erfindungs-
gemäßen Vorrichtung ist eine zweite Aufnahmeeinrichtung für Reaktions-
gefäße (4c) vorgesehen, welche zur Aufnahme von PCR-Gefäßen und
15 Probenvorbereitungsgefäßen vorgesehen ist. In dieser zweiten Aufnahme-
einrichtung kann eine Kühlung, z.B. auf 4°C, und ein Aufheizen, z.B. auf
95°C, zum Erhitzen des Lysats oder/und des Eluats erfolgen. Auch hier ist
zur Vermeidung der Kondensatbildung am Deckel von Reaktionsgefäßen
eine Deckelgegenheizung bevorzugt.

20

Gemäß noch einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung
(nicht gezeigt) ist die erste Aufnahmeeinrichtung zur Einstellung einer
Temperatur im Bereich von $\leq 70^{\circ}\text{C}$ vorgesehen. Die zweite Aufnahmee-
inrichtung ist - wie in Abbildung 3 gezeigt - für das Kühlen und Heizen von
25 Probenweiterverarbeitungs- und Probenvorbereitungsgefäßen geeignet.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen sind insbesondere zur Anwendung
in einem Verfahren wie zuvor beschrieben einsetzbar.

30 Weiterhin wird die vorliegende Anmeldung durch die folgenden Figuren und
Beispiele näher erläutert. Es zeigen:

- 13 -

Abbildung 1 die schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Abbildung 2 die schematische Darstellung einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

5 Abbildung 3 die schematische Darstellung einer dritten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Abbildung 4 das Ergebnis eines Chlamydien-Nachweises durch PCR mit manueller und semiautomatisierter Probenvorbereitung,

Abbildung 5 das Ergebnis eines Chlamydien-Nachweises durch PCR mit
10 semiautomatisierter Probenvorbereitung und unterschiedlichen Temperaturprofilen bei der Probenvorbereitung,

Abbildung 6 das Ergebnis eines HIV-Nachweises durch PCR mit manueller Probenvorbereitung (Standardprotokoll) und semiautomatisierter Probenvorbereitung bei Raumtemperatur.

15

Beispiele

1. Herstellung von magnetischen Glaspartikeln

20 Es wurden zwei verschiedene Sole verwendet. Die Herstellung der Sole erfolgte wie folgt:

Sol 1: ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3:\text{Na}_2\text{O} = 40:8:2$)

25 Alkokolate der Oxide wurden in obigen Molverhältnissen analog der Vorgehensweise in Beispiel 1 und 2 von WO96/41811 miteinander zu einer homogenen Phase verrührt. In Abweichung dazu wurde kein HCl eingesetzt.

Anschließend wurden 30 g Iriodin 600 Black Mica (Merk) in 100 ml Sol
30 eingerührt.

Sol 2: (SiO₂:B₂O₃:K₂O:Al₂O₃:CaO = 76:15:5:2:2)

Alkokolate der Oxide wurden in obigen Molverhältnissen analog der Vorgehensweise in Beispiel 1 und 2 von WO96/41811 miteinander zu einer
5 homogenen Phase verrührt. In Abweichung dazu wurde kein HCl eingesetzt.

Anschließend wurden 30 g Iridin 600 Black Mica (Merk) in 100 ml Sol
eingeführt.

10 Die Sole wurden anschließend einem Sprühtrocknungsvorgang unterzogen.

Das durch die Sprühtrocknung erhaltene Pulver wurde einer Feinteilabtrennung durch Sedimentation, einer Temperaturbehandlung unter Stickstoffatmosphäre (60 l/h Volumenstrom) bei einer Aufheizgeschwindigkeit
15 von 1 K/min unterzogen und 1 h einer Verdichtungstemperatur im Bereich von 600 bis 700°C für eine Stunde gehalten. Anschließend wurde der Ofen auf 300°C abgekühlt und bei dieser Temperatur für 1 h mit Sauerstoff gespült. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die magnetischen Glaspartikel entnommen und zur Abtrennung des Grobanteils
20 auf ein 50 µm-Sieb aufgegeben und gesiebt.

Die aus Sol 1 erhaltenen magnetischen Glaspartikel sind insbesondere zur Isolierung von DNA geeignet. Die aus Sol 2 erhaltenen Glaspartikel sind
insbesondere zur Isolierung von RNA geeignet.

25

2. Standardprotokoll zur Probenvorbereitung für die Isolierung von Nukleinsäuren, z.B. DNA

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben wie etwa Vollblut
30 oder kultivierten Zellen ist das folgende Standardprotokoll geeignet. Die auf diese Weise erhaltenen Nukleinsäuren können direkt nach der Elution für

- 15 -

eine Amplifikation durch PCR, eine Restriktionsspaltung oder einen Southernblot eingesetzt werden.

Der Reaktionskit enthält:

5

1. Bindepuffer (4,7 mol/l Guanidiniumhydrochlorid, 10 mmol/l Harnstoff, 10 mmol/l Tris HCl, 20% Triton® X-100, pH 5,7
2. lyophilisierte Proteinase K (zur Auflösung in H₂O auf eine Konzentration von 20 mg/ml)
- 10 3. Waschpuffer (56% (v/v) Ethanol, 20 mmol/NaCl, 10 mmol/l Tris HCl pH 7,5)
4. Elutionspuffer (10 mmol/l Tris pH 8,5)
5. magnetische Glaspartikel (MPG)
 - a) Tabletten mit jeweils 7,5 mg der Glaspartikel oder
 - 15 b) 15%ige Suspension der Glaspartikel in Ethanol

Die Kitkomponenten sind stabil und können bei Raumtemperatur gelagert werden. Nach Auflösung der Proteinase K in Wasser sollte die Lösung aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt werden. Die eingefrorene Lösung ist
20 für 12 Monate stabil.

Standardprotokoll

1. 200 µl Probe werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit
25 200 µl Bindepuffer und 40 µl Proteinase K-Lösung versetzt. Anschließend wird für 10 min inkubiert. Die Inkubation erfolgt vorzugsweise bei Raumtemperatur. Unter bestimmten Umständen kann die Inkubationstemperatur jedoch auch auf bis zu 70°C erhöht werden.
- 30 2. Nach der Inkubation werden 200 µl Isopropanol und eine MGP Tablette (oder alternativ 200 µl MGP Suspension) zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

- 16 -

3. Das Reaktionsgefäß wird in einen Magnetpartikelseparator (Boehringer Mannheim, Kat. No. 1 641 794) gegeben und für etwa 1 min separiert.
 - 5 4. Der Überstand wird verworfen und die Reaktionsgefäße werden aus dem MP-Separator entnommen.
 5. Nach Zugabe von 500 μ l Waschpuffer wird der Inhalt des Reaktionsgefäßes gemischt und erneut in den MP-Separator für etwa 1 min gegeben.
10
 6. Der Überstand wird verworfen. Schritt 5 wird dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wird der restliche Waschpuffer vollständig entfernt.
15
 7. Zur Elution werden 100 μ l gegebenenfalls auf 70°C vorgewärmter Elutionspuffer zugegeben. Dann wird gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird in den MP-Separator gegeben und der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt.
20
 8. Die so erhaltenen Nukleinsäuren, z.B. DNA, sind stabil und können anschließend direkt weiterverarbeitet oder bei 4°C aufbewahrt werden.
-
- 25 Das obige Protokoll kann auch entsprechend bei Mikrotiterplatten, z.B. Tieflochmikrotiterplatten (z.B. Ritter, H.J. Bioanalytic), verwendet werden.

3. Chlamydia trachomatis DNA-Nachweis durch PCR

3.1 Manuelles Standardprotokoll zur Probenvorbereitung

5 200 μ l einer Urinprobe und 240 μ l Bindepuffer/Proteinase K-Lösung (5:1) werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, einem Vortexmischen unterzogen und bei 70°C für 10 min inkubiert. Dann wird die Probe für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

10 Zur Probe werden 200 μ l isopropanolische MGP-Lösung pipettiert. Unmittelbar anschließend erfolgt Vortexmischen. Die Probe wird dann für 15 min auf einem Mischer, z.B. Thermomischer 5436 (Eppendorf), inkubiert.

Die MGP werden durch Überführung der Probe in einen Magnetseparator
15 konzentriert. Nach einer Minute wird der Überstand vollständig abpipettiert.

Es werden 0,5 ml Waschpuffer zu den MGPs pipettiert. Die Probe wird einem Vortexmischen unterzogen und dann in den Magnetseparator überführt. Der Überstand wird nach 1 min abpipettiert. Die Waschprozedur
20 wird noch zweimal wiederholt.

Den MGP werden 200 μ l Elutionspuffer zugesetzt. Die Probe wird 10 min bei 70°C auf einem Thermomischer bei 1400 RPM inkubiert. Kondenswasser wird durch kurze Zentrifugation gesammelt. Die Probe wird in den
25 Magnetseparator überführt und nach 1 min 180 μ l Eluat abgenommen. Das Eluat wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C (bei einer Aufbewahrungsdauer < 24 h) oder bei - 20°C (bei längerer Aufbewahrungsdauer) aufbewahrt.

30 Für die PCR werden 50 μ l Eluat eingesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Elektrochemilumineszenz.

3.2 Protokoll für ein semiautomatisiertes Verfahren

Statt des in 3.1 beschriebenen Vortexmischens und der Temperierung auf einem Thermoblock wird ein semiautomatisiertes Verfahren durchgeführt, bei dem das Mischen und die Temperierung auf einem Misch- und Temperiermodul erfolgt. Abbildung 4 zeigt einen Vergleich der Bestimmung von Chlamydien (Probe: 100 Elementarantikörper pro 100 ml Urin; Sechsfachbestimmung) zwischen dem manuellen Standardprotokoll (Vortex) und dem semiautomatisierten Verfahren (MTM). Es ist ersichtlich, daß durch die Automatisierung keine Beeinträchtigung der Sensitivität erfolgt.

3.3 Semiautomatisiertes Protokoll bei Raumtemperatur

Die Probenvorbereitung erfolgt wie unter Punkt 3.2 beschrieben. Die Lyse und die Elution werden jedoch bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4 Semiautomatisiertes Probenvorbereitungsprotokoll bei Raumtemperatur mit anschließender Nachbehandlung des Eluats

Die Probenvorbereitung erfolgt wie unter Punkt 3.3 beschrieben. Nach der Elution erfolgt eine Inkubation für 10 min bei 70°C.

Abbildung 5 zeigt einen Vergleich der Chlamydienbestimmung (Proben: SWE1, O Chlamydia-Elementarantikörper (EAK) pro ml Urin, SWE 2: 10 EAK, SWE 3:100 EAK und SWE 4:1000 EAK jeweils pro ml Urin) zwischen den in den Punkten 3.2, 3.3 und 3.4 beschriebenen Probenvorbereitungsprotokollen. Es ist ersichtlich, daß für die Bestimmung von Chlamydien das Standardprotokoll gegenüber einer Probenvorbereitung bei Raumtemperatur (RT-Protokoll MTM) sensitiver ist. Die Ergebnisse der Probenvorbereitung bei Raumtemperatur und anschließender Nachbehandlung des Eluats (RT-Protokoll MTM mit Nachbehandlung) zeigen jedoch, daß dieser Effekt

- 19 -

größtenteils kompensiert werden kann. Überraschenderweise ist daher während der Probenvorbereitung selbst kein Temperaturschritt erforderlich.

Durch diese Erkenntnis läßt sich das Probenvorbereitungsverfahren entscheidend vereinfachen, denn die Schritte der Lyse, der Adsorption, des Waschens und der Elution können bei Temperaturen $\leq 40^{\circ}\text{C}$ erfolgen, was eine Automatisierung vereinfacht, da keine Deckelgegenheizung und Temperaturregulierung erforderlich ist.

10 4. HIV-RNA Nachweis durch PCR

4.1 Manuelles Standardprotokoll zur Probenvorbereitung

15 Geforenes Plasma wird 5 min bei 37°C aufgetaut und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt.

In ein 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß werden 50 μl einer Proteinase K Lösung (25 mg/ml) pipettiert. Dazu werden 250 μl Probe gegeben und im Vortex gemischt. Dann werden 300 μl Lysepuffer zugegeben und erneut im
20 Vortex gemischt.

Es wird 10 min bei Raumtemperatur auf einem Eppendorfmischer bei 13.000 RPM inkubiert. Dann werden 300 μl einer MGP Suspension (6 mg/ml MGP in Isopropanol) zugegeben, im Vortex gemischt und 20 min bei
25 Raumtemperatur bei fortgesetztem Mischen inkubiert. Die MGP werden auf einem Magnetseparator abgetrennt und der Überstand vollständig entfernt.

Zu den MGP werden 750 μl Waschpuffer gegeben. Die MGP werden resuspendiert und wie zuvor beschrieben abgetrennt. Die Waschprozedur
30 wird viermal wiederholt, wobei am Ende der Waschpuffer sorgfältig entfernt wird.

- 20 -

Dann werden 100 μ l Elutionspuffer zugegeben und die MGP resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation bei 80°C auf einem Eppendorf Thermomischer (13.000 RPM) werden 90 μ l Eluat in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende HIV-Bestimmung durch RT-PCR werden 40 μ l Eluat
5 verwendet.

4.2 Semiautomatisiertes Standardprotokoll für die Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt wie unter Punkt 4.1 beschrieben, abgesehen
10 davon, daß das Mischen und die Temperierung auf einem Misch- und Temperiermodul erfolgte.

4.3 Semiautomatisiertes Protokoll bei Raumtemperatur

15 Die Probenvorbereitung erfolgt im wesentlichen wie unter Punkt 4.2 beschrieben, außer daß alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Inkubationsdauer für Lyse, Adsorption und Elution beträgt jeweils 15 min.

20 Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, daß durch die Automatisierung und die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur (RT-Protokoll MTM) keine Beeinträchtigung der Sensitivität gegenüber dem Standardprotokoll bei manueller Probenvorbereitung (manuell) erfolgt. Sowohl bei negativen, niedrigpositiven, mittelpositiven und hochpositiven Plasmen werden
25 reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Ansprüche

1. Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe,
5 umfassend die Schritte:
- (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
 - (b) Zugabe einer festen Adsorptionsmatrix,
 - (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die
Adsorptionsmatrix bindet,
 - 10 (d) Entfernen nichtgebundener Probenbestandteile aus dem
Reaktionsgefäß,
 - (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der
Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
 - (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix.
- 15
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß Schritt (a) die Zugabe einer Protease und eines Denaturierungspuffers umfaßt.
- 20
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Proteinase K als Protease verwendet.
- 25
4. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Denaturierungspuffer, der ein Guanidiniumsalz,
insbesondere Guanidiniumhydrochlorid oder/und Guanidiniumthiocyanat
enthält, verwendet.

- 22 -

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man magnetische Glaspartikel als feste Adsorptionsmatrix
verwendet.
- 5
6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die magnetischen Glaspartikel in Form einer Suspension
zugegeben werden.
- 10
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Glaspartikel verwendet, deren Glasphase SiO_2 , B_2O_3 und
 Na_2O oder SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , CaO und K_2O enthält.
- 15
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Adsorptionsmatrix einer Menge zugegeben wird, die um
höchstens 50% über der Menge liegt, die zur quantitativen Bindung
des in der Probe vorliegenden Analyten benötigt wird.
- 20
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß zumindest während der Schritte (c), (d) oder/und (e) ein
kontinuierliches oder intervallartiges Mischen ohne Zusatz externer
Mittel erfolgt.
- 25
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mischen durch Drehung des Reaktionsgefäßes um seine
Längsachse erfolgt.
- 30

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Dauer zur Durchführung der Schritte (c) oder/und (e) jeweils
maximal 20 min beträgt.
- 5
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß Schritt (d) ein gegebenenfalls mehrmaliges Zugeben und
Absaugen eines Waschpuffers umfaßt.
- 10
13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Waschpuffer mit einem Gehalt von mindestens 50%
(v/v) eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels
verwendet.
- 15
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Schritt (e) zusätzliche Reagenzien wie etwa Enzyme zugesetzt
werden.
- 20
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Schritt (e) zur Elution ein Puffersalzpuffer verwendet wird.
- 25
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
da in Schritt (e) zur Elution ein Nukleinsäureamplifikations-Mastermix
zugesetzt wird.
- 30

- 24 -

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß zumindest die Schritte (c) und (d) bei einer im wesentlichen
gleichen Temperatur durchgeführt werden.
- 5
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß auch Schritt (a) oder/und Schritt (e) bei einer im wesentlichen
gleichen Temperatur durchgeführt werden.
- 10
19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Temperatur im Bereich von Raumtemperatur bis 40°C liegt.
- 15
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Temperatur im Bereich von 18°C bis 32°C liegt.
- 20
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß Schritt (a) oder/und Schritt (e) bei einer erhöhten Temperatur
durchgeführt werden.
- 25
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß nach Schritt (f) ein Nachbehandlungsschritt bei erhöhter
Temperatur erfolgt.
- 30
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet
daß die erhöhte Temperatur im Bereich von mehr als 40°C bis 95°C
liegt.

24. Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:
- (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
 - (b) Zugabe einer festen Adsorptionsmatrix,
 - 5 (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
 - (d) Abtrennen der nichtgebundenen Probenbestandteile von der Adsorptionsmatrix,
 - (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der
10 Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
 - (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix,
- wobei zumindest die Schritte (c) und (d) bei im wesentlichen der gleichen Temperatur durchgeführt werden.
- 15 25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Analyt eine Nukleinsäure ist.
- 20 26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchführung des Verfahrens in einer automatisierten Vorrichtung erfolgt.
- 25 27. Verfahren nach Anspruch 1 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte (a) bis (e) in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.
- 30 28. Reagenzienkit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, umfassend
- (a) eine Protease,

- 26 -

- (b) einen Probenaufschlußpuffer,
- (c) einen Waschpuffer,
- (d) einen Elutionspuffer und
- (e) eine Suspension von magnetischen Glaspartikeln.

5

29. Reagenzienkit zur Isolierung von DNA, umfassend magnetische Glaspartikel, deren Glasphase SiO_2 , B_2O_3 und Na_2O enthält.

10

30. Reagenzienkit zur Isolierung von RNA, umfassend magnetische Glaspartikel, deren Glasphase SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , CaO und K_2O enthält.

31. Vorrichtung zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend

15

- einen Probenvorbereiter (1),
- eine Aufnahmeeinrichtung für Reagenzien (2),
- eine erste Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung (3), die für eine Betriebstemperatur von $\leq 70^\circ\text{C}$, insbesondere $\leq 40^\circ\text{C}$ eingerichtet ist,
- 20 - eine zweite Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße (4a, 4b, 4c), die gegebenenfalls Kühl- oder/und Heizmittel enthält,
- und ein Robotik-Werkzeugmittel (5).

20

- 32. Vorrichtung nach Anspruch 31,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß ein einziges Reaktionsgefäß zum Aufschluß einer Probe, zur Adsorption des Analyten an eine feste Adsorptionsmatrix, zum Waschen der Adsorptionsmatrix und zur Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.

30

- 27 -

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 oder 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme der Reaktions-
gefäße für die Probenvorbereitung zumindest für die Adsorption des
5 Analyten an eine feste Adsorptionsmatrix und für das Waschen der
Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.
34. Vorrichtung nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß die erste Aufnahmeeinrichtung weiterhin zur Aufnahme der
Reaktionsgefäße für die Probenvorbereitung für das Aufschluß der
Probe oder/und für die Elution des Analyten von der Adsorptions-
matrix vorgesehen ist.
- 15 35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Reaktions-
gefäßen zur Aufbewahrung oder/und Weiterverarbeitung des
Analyten vorgesehen ist.
- 20 36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Gefäßen für
Reagenzien zur Weiterverarbeitung der Probe vorgesehen ist.
- 25 37. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Reaktions-
gefäßen für zumindest einen Behandlungsschritt bei erhöhter
30 Temperatur vorgesehen ist, der ausgewählt ist aus dem Aufschluß
der Probe, der Elution der Probe von der Adsorptionsmatrix und
einem Nachbehandlungsschritt nach der Elution.

38. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste Aufnahmeeinrichtung Mittel zur magnetischen Separation umfaßt.
- 5
39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste Aufnahmeeinrichtung Mittel zum Mischen der Reaktionsgefäße durch Drehen um deren Längsachse umfaßt.
- 10
40. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Robotik-Werkzeug automatische Pipettiereinrichtungen und gegebenenfalls Mittel zum Öffnen und Schließen von Reaktionsgefäßen umfaßt.
- 15
41. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Robotik-Werkzeug Mittel zum Transport von Reaktionsgefäßen zwischen erster und zweiter Aufnahmeeinrichtung umfaßt.
- 20
42. Magnetische Glaspartikel umfassend einen magnetischen Kern und eine Glashülle, die SiO_2 , B_2O_3 , ein Alkalimetalloxid und gegebenenfalls Al_2O_3 und ein Erdalkalimetalloxid enthält.
- 25
43. Glaspartikel nach Anspruch 41,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Glashülle SiO_2 , B_2O_3 und Na_2O oder SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O und CaO enthält.

Abb. 1

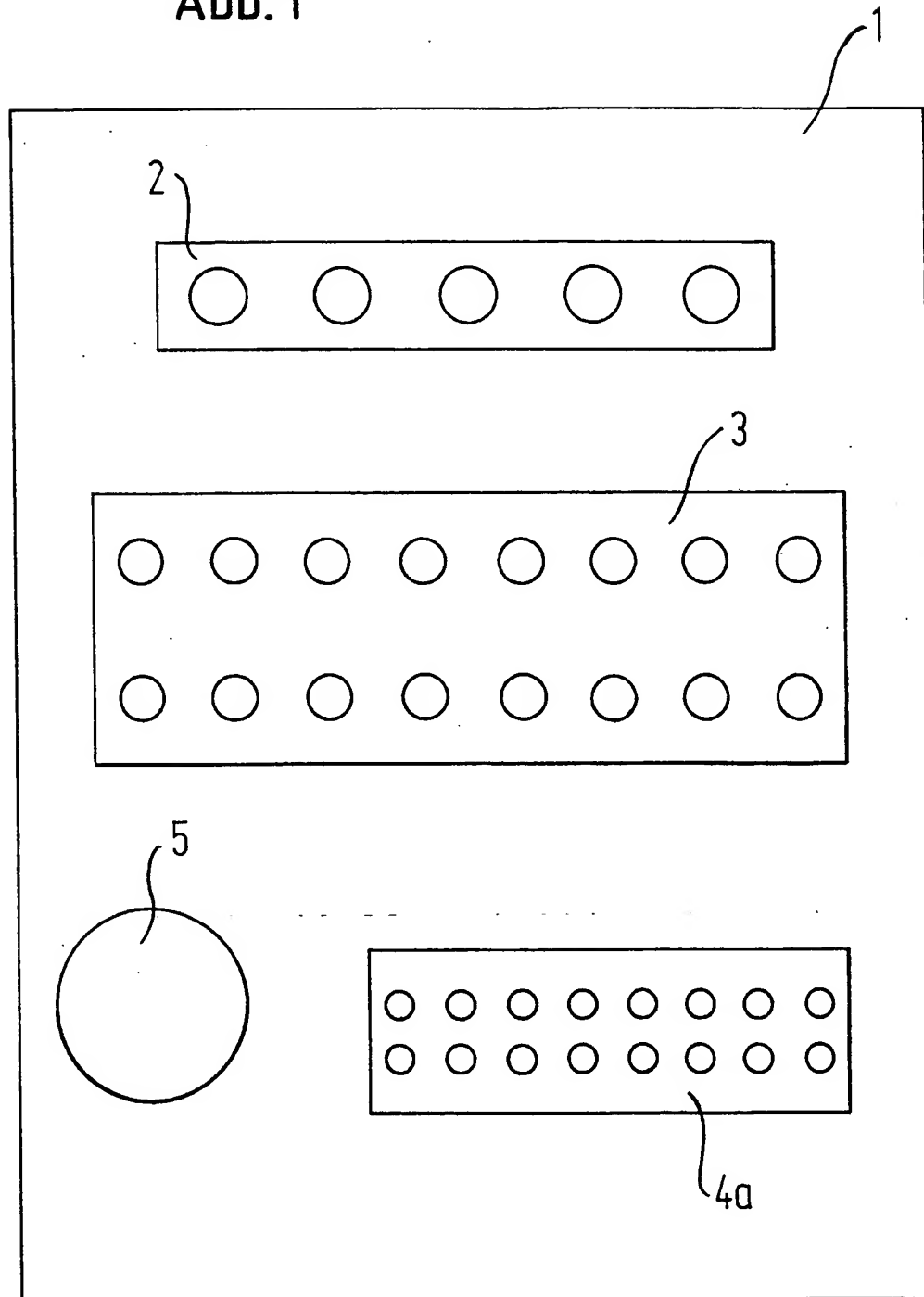


Abb. 2

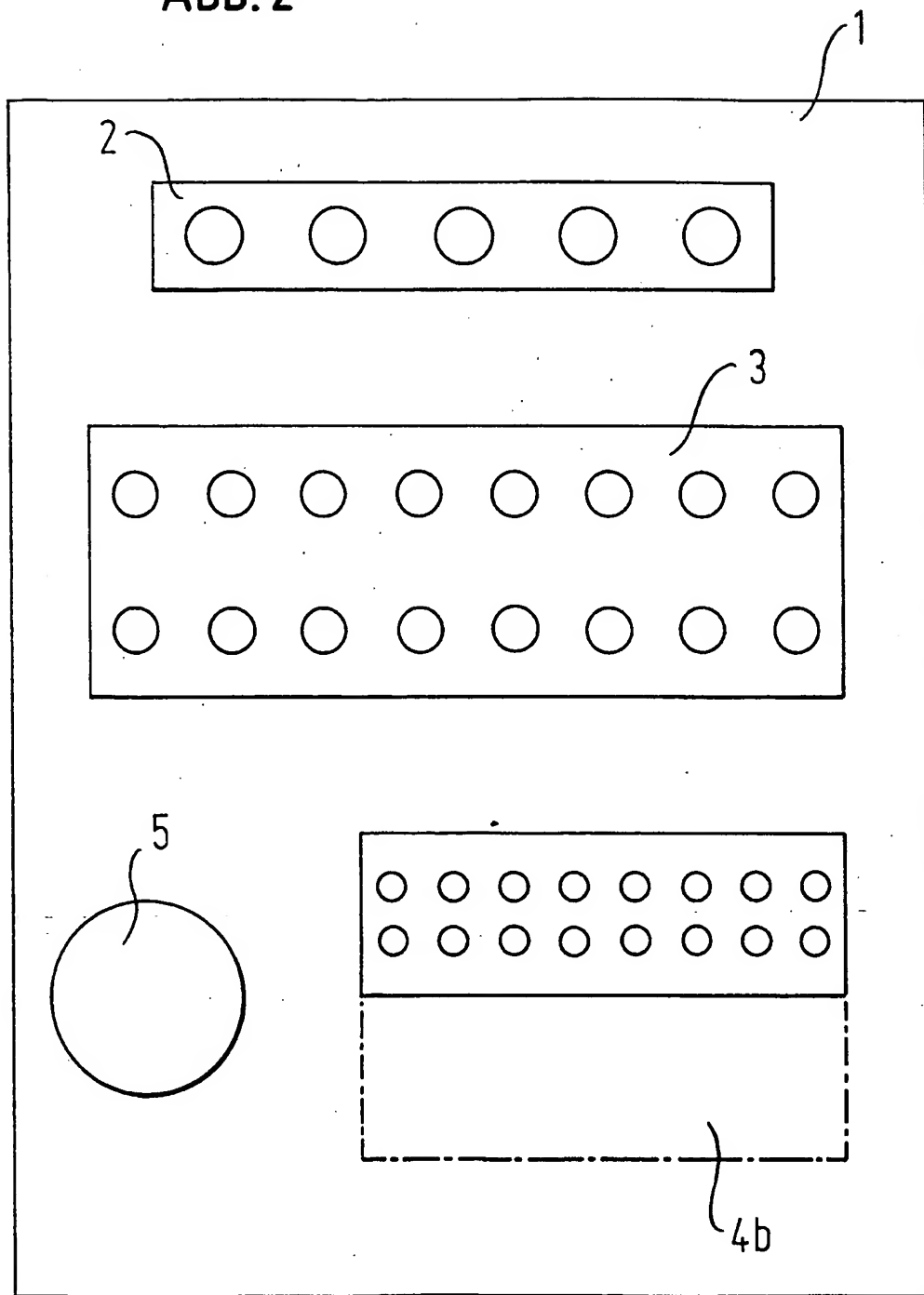
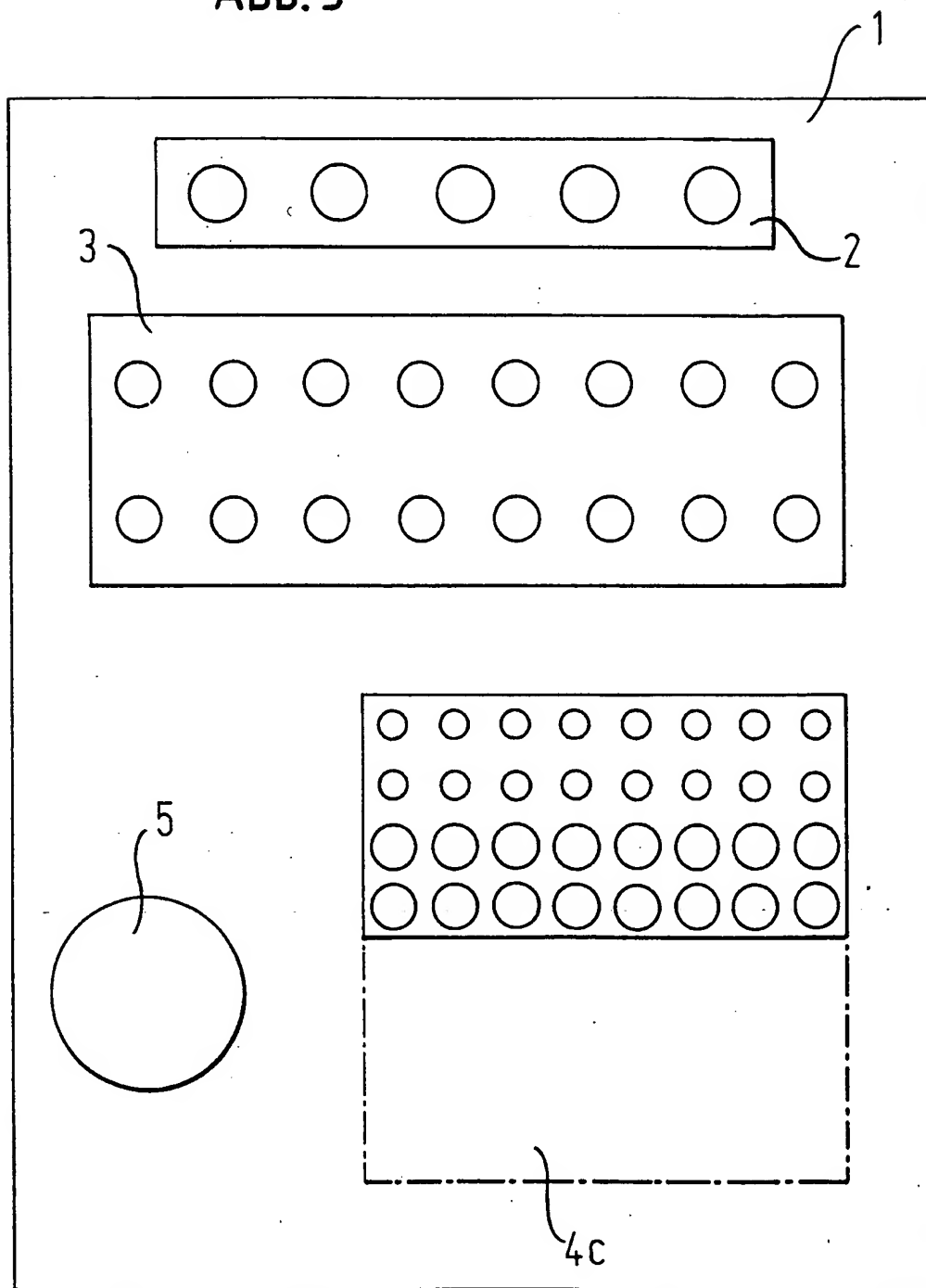


Abb. 3



4 / 6

Abb. 4

Vergleich Standardprotokoll manuell und Standardprotokoll MTM/Beispiel: Chlamydia

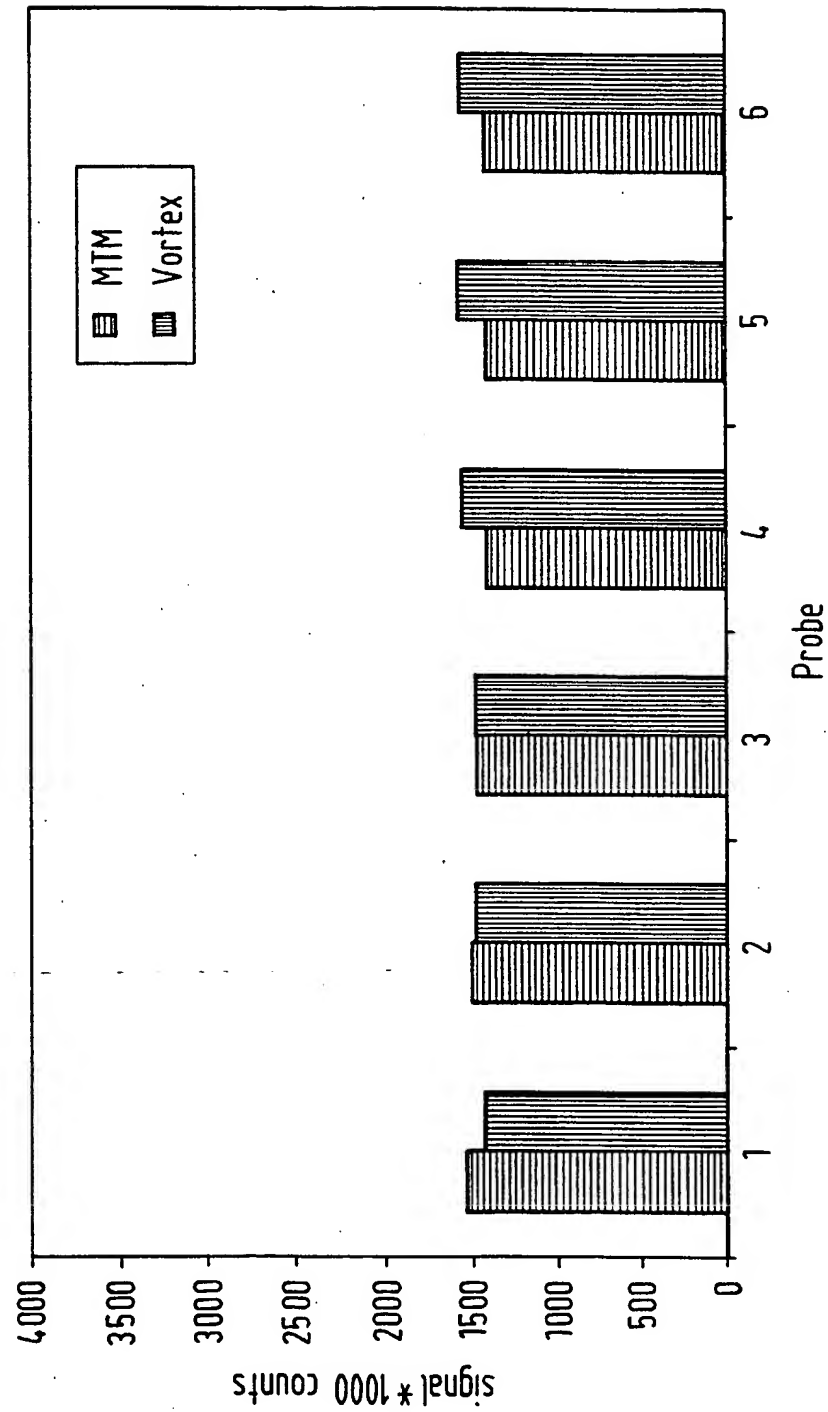
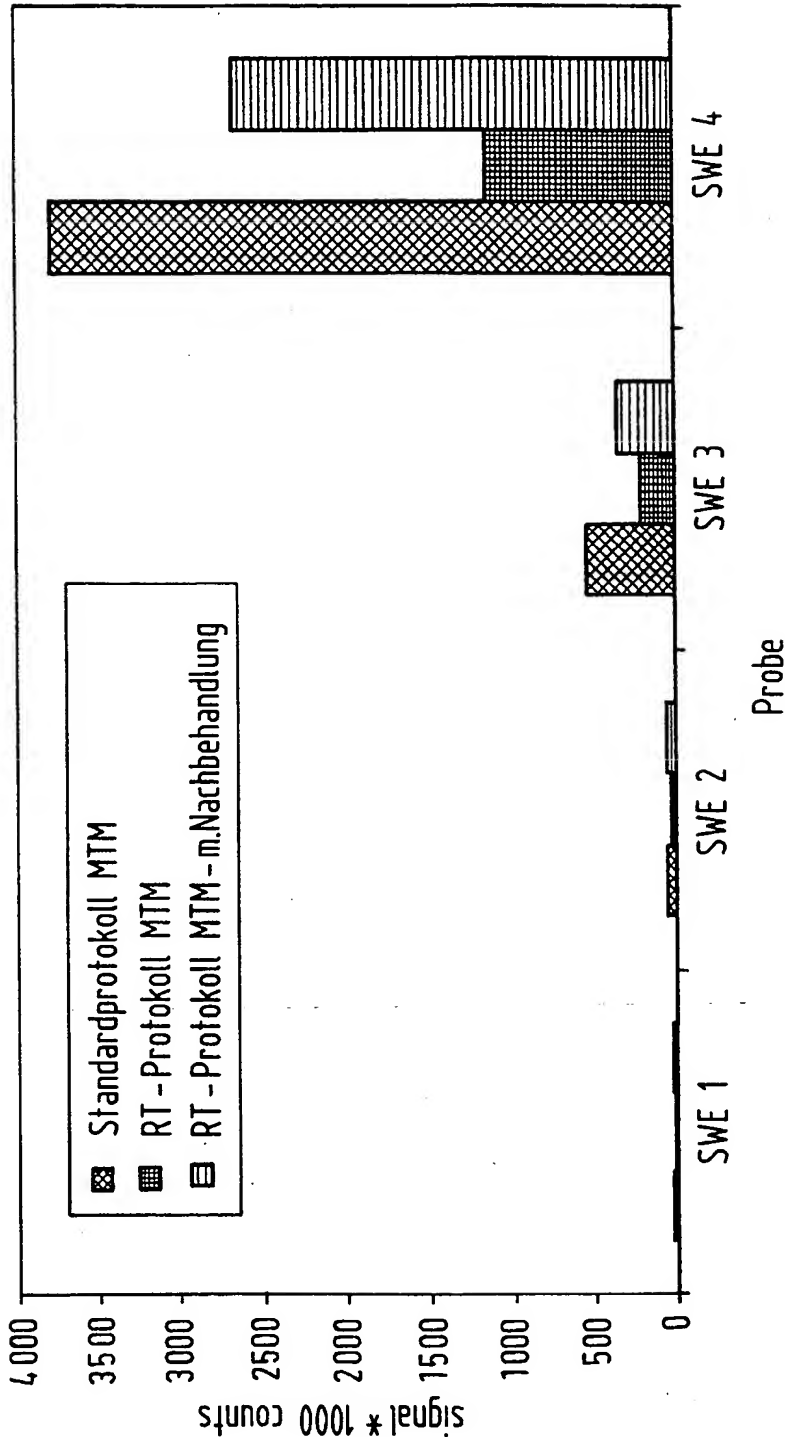


Abb. 5



6 / 6

Abb. 6

